

クラス Ib 遺伝子の分子遺伝学的解析

— ラット Tla および CD1 相同遺伝子の同定 —

高山 晋一 松浦 晃洋

札幌医科大学第1病理 (主任 菊地浩吉 教授)

Molecular Genetic Analysis of Class Ib MHC-related Genes. Identification of Rat Homologues of Tla and CD1 Genes.

Shinichi TAKAYAMA and Akihiro MATSUURA

Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. K. KIKUCHI)

ABSTRACT The class Ib antigens are a group of molecules structurally related to classical class I molecules (H-2K, -D, HLA-A, -B, -C) non-covalently associated with β 2-microglobulin. The function of class Ib is still uncertain. No class Ib homologous genes have been extensively investigated besides mice and humans. If these class Ib molecules have an indispensable integrated function, they would be conserved in evolution. We investigated the conservation of two class Ib molecules, TL and CD1 antigens, which had been thought to be homologous products. The following results were obtained. (1) Tla genes are conserved in mouse-like rodents (mouse, rat and hamster), but not in other mammals (human, rabbit, guinea-pig and mongolian-gerbil). (2) A partial DNA sequence of the rat Tla homologues have a high DNA similarity to mouse T18^d gene encoding TL antigen. (3) Transcription of rat Tla genes has not been detected. (4) At least two CD1 genes have been found in rat and expressed in thymus. These results imply a possible functional complementation between TL and CD1. (Received January 6, 1992 and accepted January 28, 1992)

Key Word: Class Ib, Tla, CD1, Major histocompatibility complex(MHC), β 2-microglobulin

1 緒 言

マウス主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex; MHC) には非常に多くのクラス I 遺伝子があるがその大部分は MHC の遠位端である Qa/Tla 領域に位置している。この Qa/Tla 領域に位置するクラス I 遺伝子産物は構造的には β 2 ミクログロブリン (β 2m) と非共有結合するクラス I 抗原であるが移植免疫に関与せず non-classical class I (class Ib) と言われるものに属する¹⁾。

この Qa/Tla 領域にコードされるクラス Ib 分子の一つに胸腺の分化抗原であり、しかも白血病細胞に発現され腫瘍抗原としての性格も有している胸腺白血病 (Thymus Leukemia; TL) 抗原がある。この TL 抗原の機能はいまだ明かではないが、最近 TL 抗原が腸管

上皮に発現され $\gamma\delta$ T 細胞のリガンドとして機能している可能性が示唆されている^{2,3,4,5)}。

また、CD1 も β 2m と結合しクラス Ib (non-MHC class Ib) 分子に属する¹⁾。ヒト胸腺と T 細胞性白血病に発現していることからヒト TL 様抗原と呼ばれ、マウス TL 抗原の相同物 (ホモログ) と考えられていたが、遺伝子クローニングにより DNA や蛋白レベルでのホモロジーはあまり高くなく、直接の相同遺伝子産物ではないことが明かとなった。しかしながら、最近 CD1 も腸管上皮で発現しており、 $\gamma\delta$ T 細胞のリガンドとなりうるということが報告されるなど⁶⁾、マウス TL 抗原との機能的類似性が再び想定されるに至っている。また、TL や CD1 のみならずクラス Ib が全体としてある種の共通の機能を担っており、ひとつのクラス Ib が存在しなくても他のクラス Ib がその代償に当たるという考え

も提出されている。以上のように TL 抗原を含めたクラス Ib が共通の機能を有する可能性が明かとなりつつあるが、CD1 遺伝子がいくつかの種において証明されているにもかかわらず Tla 遺伝子はマウス以外の種では証明されていない。またラットは移植や癌の研究に頻用されているにもかかわらず、クラス I 遺伝子解析はほとんど行なわれていない。我々はラットを含め他の種における Tla 及び CD1 遺伝子を検索することがクラス Ib の構造と機能の進化を考えるうえで非常に重要であると考え解析を行なったので報告する。

2 実験方法

2.1 実験動物及び細胞

実験動物として以下の動物を用いた。WKAH/Hkm (k-ハプロタイプ), SDJ/Crj (u-ハプロタイプ), SDJ/Hok (u-ハプロタイプ), Wister/Crj (k-ハプロタイプ), LEW/HK (1-ハプロタイプ) ラット各々 5-8 週齢の雄, BALB/c, および B6 マウス, その他ハムスター, スナネズミ, モルモット, ウサギ, を使用した。

培養細胞株としては Jurkat (ヒト T 細胞白血病細胞株), FTL43 (F344 ラット由来胸腺白血病細胞株), SPRT (ラット結腸癌細胞株), MOLT4 (ヒト T-ALL 由来細胞株) を用いた。

2.2 Cellular DNA の調整⁷⁾

臓器 (主に肝, 精巣) または細胞を界面活性剤処理した後 RNaseA, proteinase K を反応させ, その後フェノール抽出, クロロフォルム抽出, 透析を経た後使用した。

2.3 RNA の調整⁷⁾

RNA は胸腺, リンパ節, 脾臓, 腸管上皮, 腎臓, 脳, 骨髄, 肺, 上記細胞株を用いた。組織あるいは細胞を GTC 溶液に浮かせたのちポリトロンで破砕溶解し CsCl 勾配法で超遠心して RNA を得た。

2.4 サザントランスファー法⁷⁾

各種制限酵素で消化した DNA をアガロース電気泳動により分画した。メンブランは Gene Screen Plus (NEN) を用いキャピラリートランスファー法 (Southern) による。

2.5 ノザントランスファー法⁷⁾

Seed, Goldberg らの方法に準じ行なった。全 RNA は上記のごとく調整したものを使用しフォルムアルデハイドゲルで電気泳動後サザンと同様の要領で 20 xSSC を用いてトランスファーした。

2.6 DNA プローブの調整

Feinberg, Vogelstein の方法⁸⁾ に準じランダムプライ

ムラベリング法を行なった。DNA, 基質, Klenow enzyme を混合し 37°C 2 時間程度作用させカラム (ウルトラフリー, ミリポア) でフリーのヌクレオチドをとりのぞき 5 分煮沸後使用した。

2.7 サザンあるいはノザンハイブリダイゼーション法⁷⁾

Denhardt 法の変法による。ハイブリダイゼーションバッファーに salmon sperm DNA を入れプレハイブリダイゼーションバッファーとして兼用し, 42°C 2 時間以上プレハイブリダイゼーションする。その後上記の方法により作成したプローブを注入し 42°C でハイブリダイゼーションさせる。非特異的結合を落とすため 2 xSSC (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate) 0.1% SDS の混合溶液を用い 65°C 20 分洗浄を行なった。十分にバックグラウンドが落ちたのち濾紙で水分を吸収しフィルムと共にカセットにはさみ -80°C で感光したのち現像した。

2.8 遺伝子クローニング

Sprague-Dawley (SD) ラット遺伝子ライブラリー (Clontech 社, CA) をマウス Tla 遺伝子特異的プローブ pTLA5 にてスクリーニングを行なった。7.5 × 10⁵ プラークを 35 枚の 15 cm プレートにまきプラークリフティング法による。ベクターは Charon4a であり EcoRI 部位にクローニングされている。

2.9 DNA 塩基配列の決定

DNA シークエンス用の template の調整は DNA fragment の長さ等により 3 種類の方法を併用した。M13 ベクターを使った ssDNA 法, pBluescript を使用し二本鎖のまま NaOH で変性させるアルカリ変性法, pBluescript と VCS-M13 をもちいて ssDNA を得るというものである。5-1, 20-1 クローンについて pTLA5 と強く反応する断片のシークエンスをした。シークエンス反応には USB 社製 Sequenase version 2.0 DNA sequencing Kit 及び ³⁵S-dATP, ³²P-dCTP を用いた。

2.10 PCR (polymerase chain reaction) 法

テンプレートとして Cellular DNA 及び cDNA (RT-PCR 法) を用いた。プライマーとして oligonucleotide を PCR-MATE (アプライド社) で合成し PERKIN ELMER CETUS 社製 DNA thermal cycler にて増幅した。ポリメラーゼには Ampli Taq (タカラ) TTH (TOYOBO) を併用した。プログラムは 94°C 1 分, 55°C 2 分, 72°C 3 分で 30 サイクル後 72°C 7 分というものを基本に段階的にアニーリング温度を変化させた。RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) のテンプレートは全 RNA 10 µg を AMV 逆転写酵素 (生化学工業

社製)で first strand cDNA 合成しその 1/100 から 1/200 量を一回の反応に用いた。

2.11 DNA プローブ

マウスから Tla 特異的のプローブを作成した。マウス, Tla 遺伝子 (T18^d) と他のクラス I 遺伝子を比較して最も特異性の高い部分をプローブとした, 5' 側のエクソン 2, エクソン 3 を含む領域を pTLA4, 3' 側のエクソン 5, エクソン 6 を含む領域を pTLA5 とした⁹⁾。

以下この 2つのプローブ, 特に 3' プローブ pTLA5 を用いて検索を行なった。

2.12 コンピューターによる塩基配列の解析

NEC 製 98 系パソコンと GENETYX, GENETYX-CD バイオデータベース (SDC ソフトウェア開発株式会社) によった。

3 結 果

3.1 サザン解析による Tla 相同遺伝子の同定

マウス Tla 遺伝子特異的のプローブ pTLA5 とホモロジーのある DNA 配列がマウス以外に見られるかどうかを検討した。マウス, ラット, ハムスター, スナネズミ, モルモット, ヒト (Jurkat DNA), ウサギ, についてサザン解析を行なったところ, マウス, ラット, ハムスターにおいてのみバンドが認められ, ヒト, ウサギ, スナネズミ, モルモットでは認められなかった。写真には, 齧歯類のみの結果を示した (Fig. 1)。つまりこのバンドは哺乳類内でも齧歯類にのみ存在し, しかも齧歯類の中でも mouse like rodent (Myomorpha) といわれる一群にのみ存在する。ラットでは, 制限酵素 EcoRI において強くハイブリダイズするバンドが 3 本ありその他にゆるい洗いの条件 (2 xSSC, 0.1%SDS,

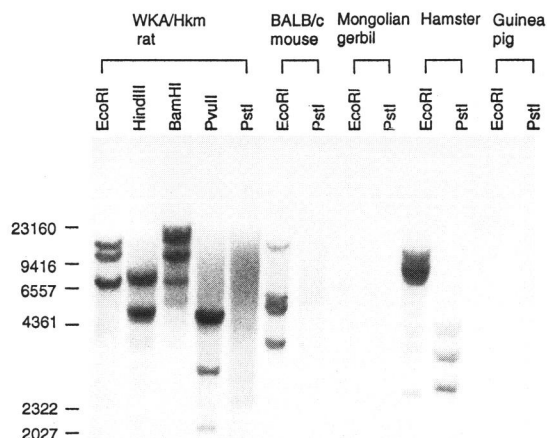


Fig. 1 Southern blot analysis of the rodent cellular DNA hybridized with pTLA5. The related DNA sequences were seen with mouse-like rodents (Myomorpha), mouse, rat and hamster, but not in guinea pig and mongolian-gerbil.

50°C, 20 分) でなければ見られないバンドが数本ある。このようにラットでは, 一方ハムスター, マウスには, このようなバンドは明らかではない。このプローブと高いホモロジーを持った DNA 断片が数種類といつかのあまり相同性の高くない DNA 断片があることが明らかとなった。

3.2 ラット Tla 相同遺伝子の単離

pTLA5 とホモロジーのある DNA 断片がラットにおいて Tla 相同遺伝子であるかどうか調べるため, 遺伝子クローニングを行なった。SD ラットの Charon4a ライブラリー (7.5×10⁵ プラーク) をマウス Tla 特異的プローブ pTLA5 でスクリーニングしてこのプローブに反応するクローンを 9 つ得ることができた。

Table 1 Cluster classification of the rat Tla clones

Cluster	Clone	Hybridization		PCR annalysis		RE sites of amplified fragments		
		H2	pTLA5	50°C	62°C	HindIII	EcoRI	PstI
1	5-1	+	++	1.6 kb	1.6 kb	0	1	1
	18-1	+	++	1.6	1.6	0	1	1
	16-1	+	++	1.6	1.6	0	1	1
2	2-1	+	+	1.6	—	1	0	0
	4-1	+	+	1.6	—	1	0	0
	7-1	+	+	1.6	—	1	0	0
	21-1	+	+	1.6	—	1	0	0
3	20-1	+	++	1.6	1.6	0	1	1
4	19-1	+	+	1.6	—	1	0	0

PCR analysis and southern hybridization with H-2 and pTLA5 probe were studied about intron 3 that is highly divergent region in class I genes. There are at least four clusters in the rat Tla genes. Clusters 1 and 3 have high similarity to mouse Tla gene.

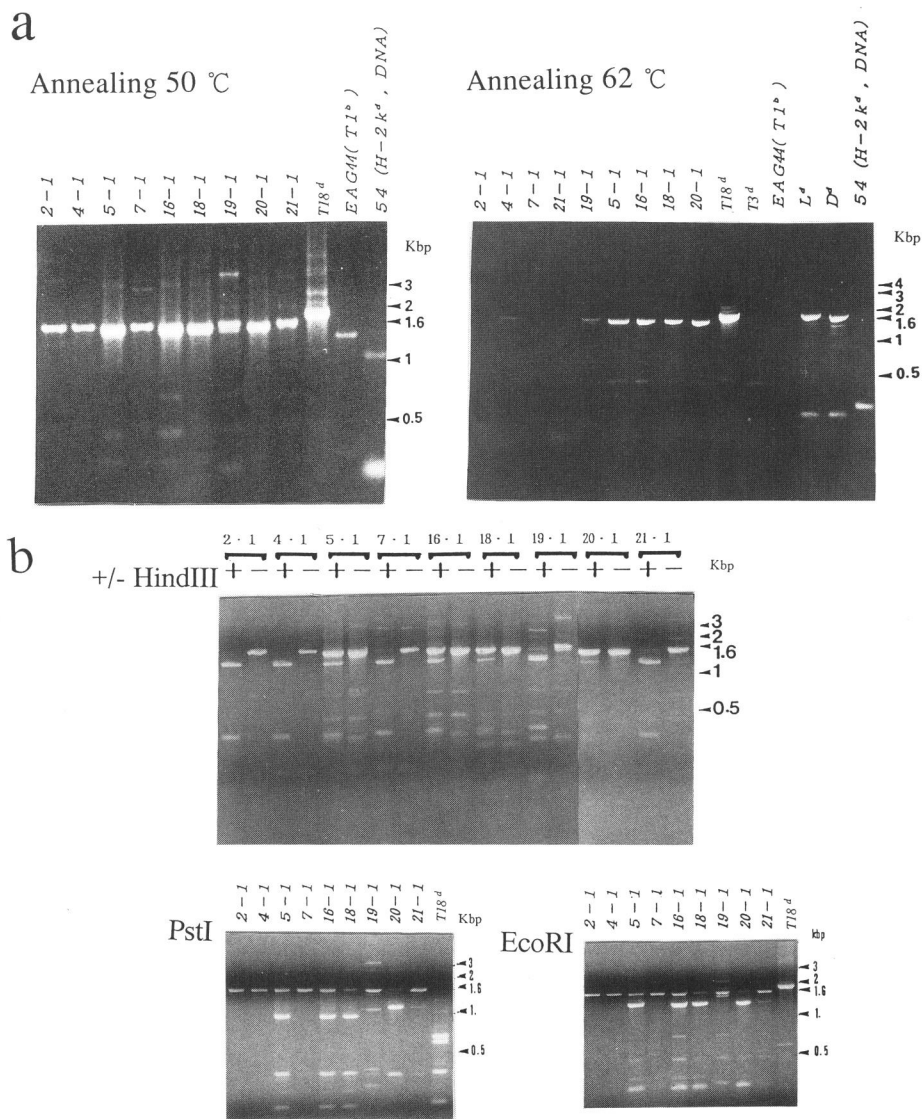


Fig. 2 a. PCR amplification of rat genomic clones with different annealing temperatures. Exon 3 forward primer (#5, 5'-GATTACTTCGCCCTGAACGAA-3') and exon 4 reverse primer (#8, 5'-CCATCT-CAGGGTGAGCGGCTC-3') were used to amplify gene segments containing part of exon 3, entire intron 3 and part of exon 4. Variations in the exon 3 sequence caused loss of amplification fragments in high annealing temperature (62°C) in some of these clones. With low annealing temperature (50°C), all clones yielded amplified 1.6 kb fragments suggesting that their DNA contained class I related sequences.

b. Restriction enzyme site mapping in PCR amplified products. After amplification of genomic clones at 50°C annealing temperature, aliquots of samples were digested with HindIII, PstI and EcoRI to investigate presence of these recognition sequence. Since intron 3 sequences were related but quite variable in class I genes, relatedness of each clones was readily determined.

3.3 ラット Tla 相同遺伝子クローンの解析

3.3.1 プローブとの反応性及び PCR による増幅.

それぞれのクローンについて制限酵素(EcoRI, HindIII, BamHI, KpnI, BgeII, PstI, PvuII)で消化後電

気泳動した。制限酵素フラグメントの長さからオーバーラップするクローンがいくつかあり、少なくとも4つのクラスターに分類できた。H-2K^dのcDNAとpTLA5をプローブとして用いサザン解析した。H-2K^dプロー

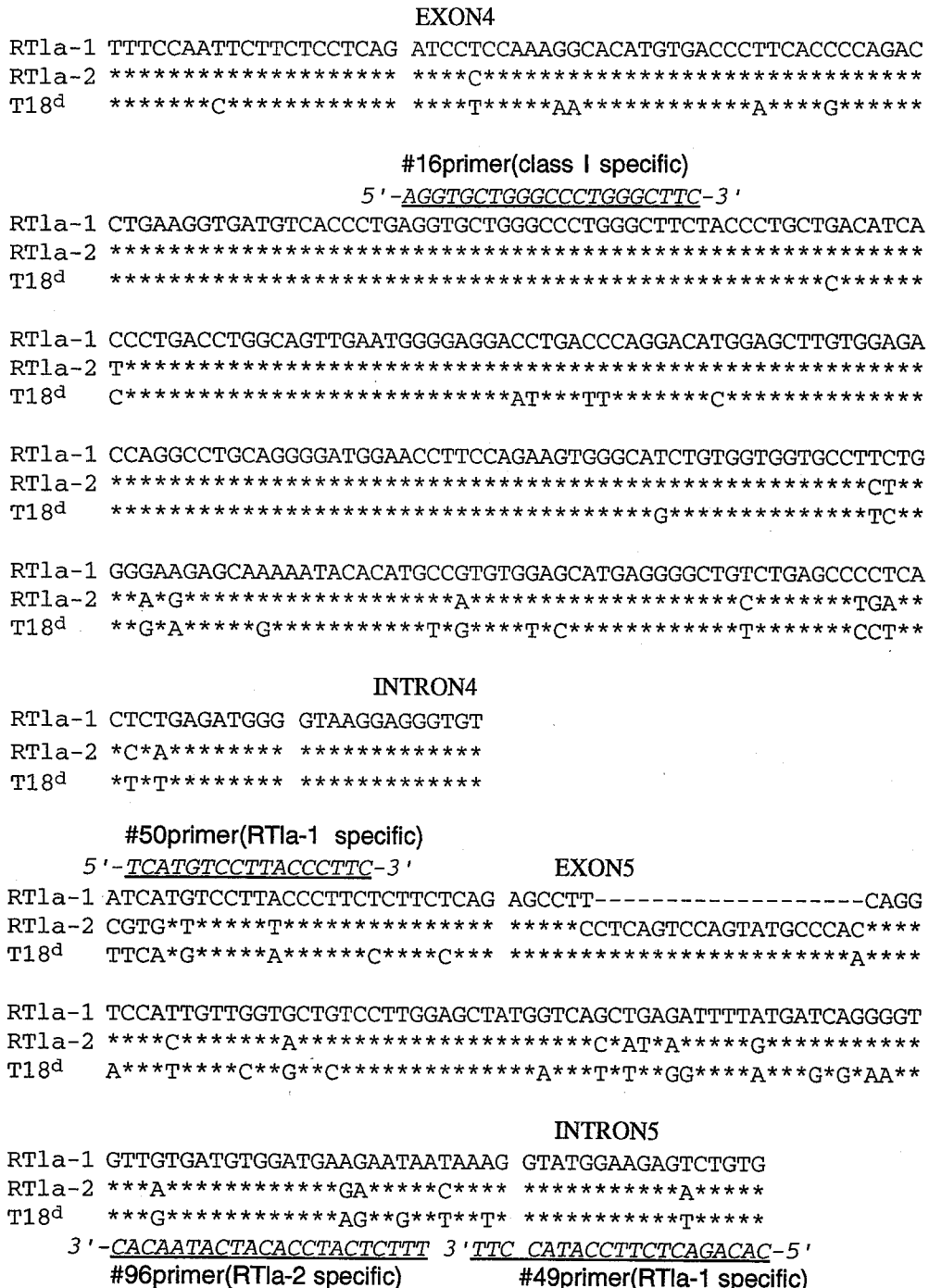


Fig. 3 The DNA sequence alignment of the fourth and the fifth exon between RT1a and mouse T1a gene (T18^d) and the position of the PCR primers. The exon 5 sequences of RT1a-1 and RT1a-2 were extremely similar to that of mouse T1a gene (T18^d) that is conserved in mouse T1a gene family. RT1a-1 had a 19-bases stretch deletion in the 5' region of fifth exon. Position of #49 and #50 primers which were used to detect the 19-base deletion (see Fig. 4). #96 primer was used to analyze expression of RT1a-2 gene with RT-PCR. The acceptor and donor sequences of splicing signal are conserved in these exon.

ブでは全てのクローン様に反応するがpTLA5を用いるとクラスター1, 3に強く反応した (Table 1). つぎにPCRによってこの4つのクラスターの特徴を解析した. クラスI遺伝子は遺伝子内に, 多型にとむ部分 (エクソン2, エクソン3)と非常に保存された領域 (エクソン4)を有することに着目し, プライマーを作成した. 5'側の変異を検出するため, エクソン3 フォワードプライマー (#5, 5'-GATTACATCGCCCTGAAC-GAA)と極めてよく保存されたエクソン4 リバースプライマー (#8, 5'-CCATCTCAGGGTGAGCGGCTC)を用いた. PCRの条件のうちアニーリング温度を50℃, 62℃と変化させることによって62℃でも増幅されるクラスター1, 3で, 塩基配列のホモロジーがより高いと考えられた (Fig. 2a, Table 1).

3.3.2 PCR産物の制限酵素部位の検索

上記プライマーで増幅される領域はエクソン3-イントロン3-エクソン4で, クラスI遺伝子間で最も塩基配列の変異が大きいイントロン3を含んでいる. このPCR産物を各種酵素で消化することにより, イントロン3内の制限酵素部位の違いを検出できると考え, PstI, EcoRI, HindIIIによる反応を行なった. この消化のパターンによってクラスター1, 3とクラスター2, 4は性格の違ものと考えられた (Fig. 2b, Table 1). 以上の様に, 詳細な制限酵素地図を作成するという時間のかかる煩雑なステップを省略し, 1) クローンとプローブの反応性, 2) PCRのアニーリング温度, 3) PCR産物の制限酵素部位の有無によってこの9つのクローンを4つのクラスターに分類できた (Table 1). 即ち少なくとも4つのラットTla遺伝子が単離できたものと考えられる. クラスター1, 3が特にマウスTla特異的のプローブと反応性が強く, それぞれRTla-1, RTla-2と命名し, 部分塩基配列の解析を行なった.

3.4 ラットTla遺伝子の部分塩基配列

3.4.1 エクソン4

図のように (Fig. 3), RTla-1, RTla-2, マウスTL抗原遺伝子 (T18^d)についてエクソン4の塩基を比較してみるとこの3つともに非常に類似していることがわかる. エクソン4については α 3ドメインをコードしておりこの部位に β 2mが主に結合し¹⁰⁾クラスI (H2)とクラスIb間でも高いホモロジーを示すことが知られている, つまりこのRTla遺伝子はクラスI遺伝子に属することが判明した.

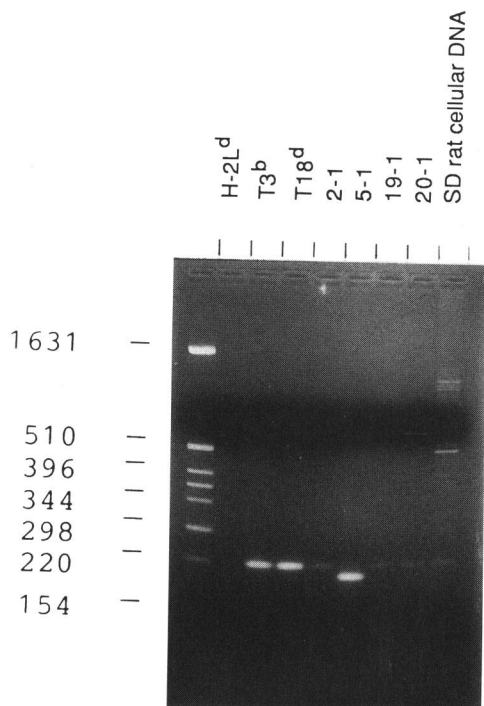
3.4.2 エクソン5

エクソン5でも同様にこれら3つの遺伝子は, 高い相同性を示していた (Fig. 3). エクソン5は主に膜通

過ドメインをコードしておりTL抗原遺伝子と他のクラスI遺伝子では, 大きく異なっていることが知られTL特異的である¹¹⁾. この結果よりRTla遺伝子は塩基配列の上からもTla相同遺伝子であると証明された.

3.4.3 エクソン5の欠失について

RTla-1にはエクソン5の5'側に19塩基の欠失がありこのためエクソン5内にストップコドンを生じる. この欠失がartificial cloningによって5-1クローンにおいてのみ見られるという可能性を否定するためエクソン5を缺む形でプライマーを設計し (Fig. 3) #49と#50プライマーを用いてPCRを行なった (Fig. 4). これによると四つのクラスターのうちクラスター1 (RTla-1)の5-1クローンにおいてマウスTla遺伝子 (T3^b, T18^d)及び他のクラスターに属するクローンよりバンドが短く, しかもこれは同じクラスター1に属する16-1, 18-1



PCR analysis
Deletion of the exon5

Fig. 4 Detection of the deletion in exon 5 of RTla-1. The rat Tla clones (2-1, 5-1, 19-1, 20-1), the mouse Tla genes T3^b, T18^d, H-2L^d and SD rat cellular DNA were amplified by #49 and #50 primers. Only cluster 1 gene (5-1) amplified product is shorter than the others, cluster1 gene has a exon 5 deletion. Specificity of Tla was given by absence of amplified fragment in H-2L^d.

Table 2 Percent similarity of the fourth and fifth exon between RT1a and other class I genes of the mouse and the rat.

Exon 4

	RT1a-1	RT1a-2	T18 ^d	T3 ^b	T1 ^d	T2A ^a	Q7 ^b	H-2K ^d	RT1. A ^a
RT1a-1		95.3%	93.1%	90.6%	88.8%	84.4%	92.4%	91.3%	94.6%
RT1a-2	95.3%		91.3%	91.7%	86.4%	83.3%	93.5%	93.1%	96.0%

Exon 5

	RT1a-1	RT1a-2	T18 ^d	T3 ^b	T1 ^d	T2A ^a	Q7 ^b	H-2K ^d	RT1. A ^a
RT1a-1		87.4%	80.0%	80.0%	77.9%	78.6%	59.5%	58.4%	63.0%
RT1a-2	87.4%		85.1%	84.2	73.7%	74.3%	61.4%	60.0%	59.2%

T18^d, T3^d, T1^b and T2A^a are the class Ib genes located in the mouse T1a region. Q7^b is the Qa region gene. H-2K^d is the classical class I gene of the mouse. RT1. A^a is the rat classical class I gene.

クローンで共通に認められる (data not shown) ことから, artificial cloning ではなく遺伝子の段階ですで見られる欠失であると考えられた。

3・4・4 他のクラス I 遺伝子との比較

各種クラス I 遺伝子, マウス T1a (T3^b, T18^d, T1^d, T2A^a), Qa (Q7^b), H2K^d, ラット RT1 (RT1. A^a) との塩基の相同性を検索した (Table 2)。RT1a はエクソン 4 でこれらクラス I と非常に高いホモロジーを示す。一方エクソン 5 ではマウス T1a 遺伝子と非常にホモロジーが高いが, マウスのクラス I 遺伝子および Qa, ラット古典的クラス I 遺伝子とはホモロジーが低いことが明らかとなった。RT1a-2 はエクソン 5 で RT1a-1 よりもマウス T1a 遺伝子 (T18^d, T3^b) とホモロジーが高く, よりマウス T1a に近似していると考えられる。エクソン 4 は上述のようにクラス I 特異的であり, RT1a でも全てのクラス I に対して非常に高いホモロジーを示している。

3・4・5 スプライスシグナル

エクソン 4 及び 5 周囲のスプライス ドナー, アクセプター配列は両遺伝子ともに保たれていた (Fig. 3)。ドナーは (C or A) AG | GTA (G or T) G (T or A), アクセプターは (CT) nN (C or T) AG | G (| はエクソン, イントロンの境界を示す) が一般的である¹¹⁾。

3・5 ラット T1a 遺伝子の転写の検索

3・5・1 ノザン解析

ラットについて胸腺, リンパ節, 脾臓, などのリンパ系組織と肝臓, 腎臓, 肺など実質臓器及び FTL43, SPRT の RNA を用いてノザン解析を行ないラット T1a 遺伝子の発現を検討した。

3・5・1・1 マウス T1a 特異的プローブ

pTLA5 では明らかなバンドは, 検出できなかった。この理由として, プローブがマウス由来でラット特異的でないため検出感度以下であることが考えられた, また RNA として転写産物がないか, 非常に微量のため検出できないとも考えられた。このためラット特異的プローブを作成することにした。

3・5・1・2 ラット T1a 特異的プローブ

ラット T1a 特異的プローブを作成しそのプローブによるサザン, ノザン解析を行ない RT1a 遺伝子特異性と転写の有無とを検討した。RT1a-1 特異的プローブは RT1a-1 のエクソン 5 ほぼ中央に位置する PvuII 部位を利用し, エクソン 5 の 3' 部分とイントロン 5 の一部を含むものを作成した。このプローブ (EX5) を用いラット cellular DNA を制限酵素 EcoRI, BglII, HindIII, PstI, PvuII, BamHI で消化した後サザン解析を施行したところ, pTLA5 を用いた場合 EcoRI 消化で 3 本確認できたバンド (Fig. 1) のうち主に 2 本のバンドしか検出できなかった。しかも約 10 kb のバンドに強くハイブリダイズするが 7 kb のバンドは, それよりも弱いという結果が得られた (Fig. 5)。これにより RT1a-1 はこの 10 kb のバンドに相当し, RT1a-2 はこの 7 kb のバンドに相当することが予想された。これらサザン解析の結果からこのプローブがラット T1a 特異的プローブと考えられた。このプローブを用いノザン解析を行ったが明らかなバンドは得られず (data not shown), 転写を検出することが不可能であった。転写産物が非常に微量なためノザンでの解析で検出できない可能性があると考え, より検出感度の高い RT-PCR 法を行なった。

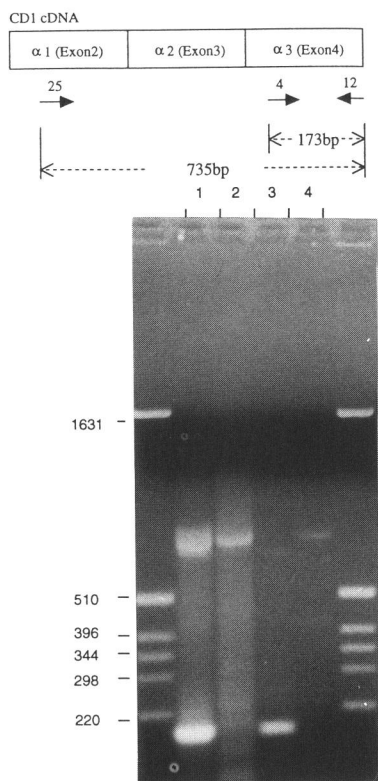


Fig. 7 Detection of the CD1 gene expression in rat. PCR primers for CD1 cDNA and amplified fragment length were shown (above). Template was Wistar rat thymus RNA. And RT-PCR performed by using of these primers.
Lane 1, 3; # 4-# 12 amplification
Lane 2, 4; # 12-# 25 amplification
Lane 1, 2; reamplification of lane4 product.
Expression of the rat CD1 gene was detected.

遺伝子の存在が明らかとなった。

3.6.2 RT-PCR による転写の検索 (Fig. 7)

図のように長いフラグメントの内側に短いフラグメントができるようにプライマーを作成した。Wistar ラットの胸腺 RNA をもちい検索した。それぞれのプライマーで予想される位置にバンドが観察された。また #25-#12 で増幅したレーン 4 の PCR 産物が #4-#12 で再度増幅できた(レーン 1)。このことからラット CD1 が発現(転写)されているということはほぼ間違いないと考えられた。

3.6.3 ラット CD1 の RT-PCR 産物の塩基配列

#4-#12PCR産物の塩基配列を一部決定した (Fig. 8). マウス CD1.1 及び CD1.2 と 92.9% と高いホモロジーを示しラット CD1 であることが確認できた.

4 考 察

クラス Ib 分子は、古典的移植抗原 (H-2, HLA) と類似した分子構成を保有するが、移植免疫には関与しない。またこのようなクラス Ib 遺伝子の存在はヒト、マウス以外ではほとんど検索されておらず、これらの遺伝子が重要な機能を有するか否かも長い間不明であった。われわれはクラス Ib 遺伝子のうち、とくにマウス TL 抗原およびヒト CD1 抗原遺伝子に着目し、その相同遺伝子が両者ともラットに存在することを明らかにすることができた。

4.1 TL

今回の検索によってラット Tla (RTla) 遺伝子の存在が塩基配列の上からも初めて証明された。RTla 遺伝子のうち RTla-1 遺伝子はエクソン 5 に 19 bp の欠失を含んでおり膜通過部分が不完全なクラス I 分子しかコー

PCR-product	GGTAACTCACAGAGGTGAGATCCTGCCAAATGCGGATGAG ** *****
mouse CD1.1	CGGGGTGACCAGGAGCAACAGGGTACTCACAGAGGTGATTTCTGCCAAATGCTGATGAG
PCR-product	ACATGGTATCTTCAAGCAACCCTGGATGTGGAGGCTGGAGACGAGGCTGGCCTGGCCTGC ***** ** *****
mouse CD1.1	ACATGGTATCTTCAAGCAACCCTGGATGTGGAGGCTGGAGAGGAAGCTGGCCTGGCCTGC
PCR-product	AGGGTGAAGCACAGCAGTCTAGAGGGCCAGGATATCATCC ***** ** *****
mouse CD1.1	AGGGTGAAGCACAGCAGCCTAGGAGGACAGGATATCATCCTCTACTGGGGTAAGAAAGAA

Fig. 8 Nucleotide sequence of rat PCR products aligned with mouse CD1.1. PCR product amplified by #4 and #12 primers was subcloned in pBluescript vector and sequence analysis was performed. Homology scoring to mouse C1.1 and CD1.2 show 92.9%. This amplified product is Confirmed to be rat CD1 homologue.

どしえない。現在進行中の RTIa-1 遺伝子の一次構造解析では、エクソン 2, 3 にも deletion, insertion の存在が示唆されており、この遺伝子は偽遺伝子である可能性が高い。今後 RTIa-2 も含めた塩基配列の解析を進める予定である。

今回のラット Tla 相同遺伝子の発見にはクラス I 遺伝子進化において非常に重要な意味がある。現在まで、多くのクラス I 遺伝子がクローニングされ、その一次構造が明らかになってきた。これらの遺伝子を比較すると霊長類（ヒトとチンパンジー、タマリン）の間では直接の相同遺伝子（direct equivalent）が存在し種の分岐以前にいくつかのクラス I 遺伝子が生じ、種分岐後も各々の種において存続、機能していることが証明されている（trans species evolution）。一方齧歯類では、マウスとラットには直接の相同遺伝子は存在せずマウスクラス I 同士、ラットクラス I 同士の方が塩基配列の類似性が高い。即ち齧歯類ではラットとマウスが分岐した後にクラス I 遺伝子群が各々の種において重複し gene conversion などにより遺伝情報を交換し、均一化しながら発達した（協調進化 concerted evolution）と考えられ、霊長類と齧歯類でクラス I 遺伝子の進化のプロセスが異なるとの説が提唱されている¹²⁾。しかし RTIa 遺伝子はマウス Tla 遺伝子の直接の相同遺伝子であることが明らかであり、齧歯類のクラス I 進化にも霊長類同様 trans species evolution が存在することが証明できた。

4・2 TL の発現と機能的意義

最近になって古典的移植抗原（H-2）を発現していない embryonal cell carcinoma 上に Tla 領域遺伝子が発現していることが証明された。これらの細胞株の一つ PCC3 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞ハイブリドーマ（KN6）の反応性から、この KN6 が embryonal cell carcinoma 上に発現している Tla 領域にあるクラス I 遺伝子 T22^b 産物をリガンドとして認識しているということが明らかとなった⁵⁾。また $\gamma\delta$ T 細胞の浸潤が多く見られる腸管上皮^{3, 4)}に TL 抗原が発現されていることも証明された¹²⁾。驚いたことには正常では TL 抗原を発現してではなく TL-ストレイ¹³⁾といわれる B6 マウスにおいてもこの腸管上皮に TL 抗原が証明され T3^b が機能していることが明らかになった²⁾。TL トランスジェニックマウスの解析でも高率に $\gamma\delta$ T 細胞性白血病を生じたり、胸腺において $\gamma\delta$ 型 T 細胞の分化異常を生じる¹⁴⁾ など TL 抗原が胸腺の分化と $\gamma\delta$ 型 T 細胞に関係していると報告され、マウスでは TL 抗原が $\gamma\delta$ T 細胞のリガンドであると考えられつつある。また例えば最近の知見と

して heat shock protein がクラス Ib 分子の一つである Qa-1 の発現を調節していることが明らかとなった¹⁵⁾。heat shock protein は $\gamma\delta$ T 細胞のリガンドの一つであるとも考えられておりこれも間接的に $\gamma\delta$ T 細胞とクラス Ib 遺伝子の関係を示唆するものである。その他にもマウス TL 抗原がマウス、ヒトの CD8 と結合しうることが示された¹⁶⁾。さらにヒトにおいても HLA-G 領域のクラス Ib と CD8 との反応性も証明され¹⁷⁾、CD8 陽性のキラー T 細胞（CTL）に認識される可能性が示唆されている。これらのことは、腸管上皮内リンパ球が CD8 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞であることに関係していると思われる。

このようにマウス TL 抗原の生理的意義が推測されているが、我々の解析ではマウス以外の動物の Tla 遺伝子は齧歯類のしかも mouse-like rodent といわれる種にのみ限局しており、ラットでの転写も確認できなかった。もしマウスで TL 抗原の機能が非常に重要で生命を維持するのに必須なものであるとしたら他の動物では、それにとって代わることができる遺伝子及び遺伝子産物が存在すると考えられる。

4・3 CD1 遺伝子の保存

TL 抗原が発現していない動物ではほかのクラス I 分子がこのような役割を担っているであろうか、あるいは認識する側つまり T 細胞の抗原受容体（TCR）に変異があるとも考えられる。例えばヒトでは腸管上皮間に浸潤しているリンパ球は大部分 $\alpha\beta$ 型 T 細胞が占めている。また前者の可能性を考える場合マウスの TL と分布、構造を同じくする分子の解析をすることが最も簡単な TL の機能的相同分子を見いだす方法であると考え、クラス Ib 特に CD1 に着目した。それは胸腺特異的に発現していること、最近腸管上皮にも見いだされていること、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞のリガンドの一つ TCT.1（Blast-1）がヒト第一染色体領域にマップされていることが明らかになったことなどに基づいている⁶⁾。我々は RT-PCR と部分塩基配列の決定によりラット CD1 遺伝子の存在と胸腺における発現（転写）をはじめて明らかにすることができたが、今後 cDNA クローニングにより詳細に解析し、TL と CD1 の機能的類似性について検討を加える予定である。現在まで CD1 遺伝子はヒト CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e¹⁸⁾ まで明らかにされている。CD1a, b, c, は胸腺に発現し、一方 CD1d は全く性質が異なりリンパ組織には見られず腸管上皮^{19, 20)}に存在する。マウスでは CD1.1, CD1.2 遺伝子があり²¹⁾腸管上皮²²⁾及び肝臓に主に発現されている。Milstein らによれば CD1 は CD1A ファミリー

と CD1D-like ファミリーに分けられ、CD1 遺伝子のサザン解析を用いた検索によるとヒト、アカゲザル、ウサギ、ブタ、ウシ、ヒツジではこの両者の遺伝子ファミリーがあるがマウス、ラットには CD1D-like ファミリーしか存在しないという。このことの意味は、これから遺伝子産物の機能があきらかでない今、まだ明確な解答はないが、今後ラット Tla 遺伝子と CD1 遺伝子の解析が進行すればこれらの遺伝子ファミリーの動物間での相違あるいは機能的補完性を説明することができるかもしれない。

5 結 語

クラス Ib の機能を明らかにするため齧歯類特にラットを中心として Tla, CD1 遺伝子とその発現について解析し以下の結果を得た。

- (1) Tla 遺伝子は、齧歯類の中でもマウス、ラット、ハムスターでのみ保存されておりスナネズミ、モルモットでは見られない。
- (2) ラット Tla 遺伝子をクローニングした。少なくとも 2 種類あり RTla-1, RTla-2 とした。
- (3) ラット Tla 遺伝子の発現は検索した範囲では、確認できなかった。
- (4) ラットにおける CD1 遺伝子とその発現を RT-PCR によってはじめて明らかにできた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただきました本学病理学第 1 講座菊地浩吉教授に深謝いたします。また御協力いただきました病理学第一講座の教室員及び研究補助員各位に感謝いたします。

文 献

1. Strominger, J. L.: The $\gamma\delta$ T cell receptor and class Ib MHC-related proteins: enigmatic molecules of immune recognition. *Cell* **57**, 895-898 (1989).
2. Wu, M., Kaer, L. V., Itohara, S. and Tonegawa, S.: Highly restricted expression of the thymus leukemia antigens on intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* **174**, 213-218 (1991).
3. Goodman, T. and Lefrancis, L.: Expression of the $\gamma\delta$ T-cell receptor on intestinal CD8⁺ intraepithelial lymphocytes. *Nature* **333**, 855-858 (1988).
4. Bonneville, M., Janeway C. A., Jr., Ito, K., Haser, W., Ishida, I., Nakanishi, N. and Tonegawa, S.: Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of $\gamma\delta$ T cells. *Nature* **336**, 479-481 (1988).
5. Ito, K., Kaer, L. V., Bonneville, M., Hsu, S., Murphy, D. B. and Tonegawa, S.: Recognition of the product of a novel MHC TL region gene (27^b) by a mouse $\gamma\delta$ T cell receptor. *Cell* **62**, 549-561 (1990).
6. Del, P. P., Mami, C. F., Bruneau, J. M., Jitsukawa, S., Dumas, J., Harnois, M. and Hercend, T.: TCT. 1, a target molecule for gamma/delta T cells, is encoded by an immunoglobulin superfamily gene (Blast-1) located in the CD1 region of human chromosome 1. *J. Exp. Med.* **173**, 1339-1344 (1991).
7. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring Harbor, NY: Cold spring Harbor Laboratory Press (1989).
8. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.: A technique for radio labelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13 (1983).
9. Fisher, D. A., Hunt, S. W., III. and Hood, L.: Structure of a gene encoding a murine thymus leukemia antigen, and organization of Tla genes in the BALB/c mouse. *J. Exp. Med.* **162**, 528-545 (1985).
10. Tysoe, C. V., Grundy, J. E. and Perkins, S. J.: Molecular comparisons of the beta 2-microglobulin-binding site in class I major-histocompatibility-complex alpha-chains and proteins of related sequences. *Biochem. J.* **277**, 359-369 (1991).
11. Brorson, K. A., Hunt, S. W., III., Hunkapiller, T., Sun, Y. H., Cheroutre, H., Nickerson, D. A. and Hood, L.: Comparison of exon 5 sequences from 35 class I genes of the BALB/c mouse. *J. Exp. Med.* **170**, 1837-1858 (1989).
12. Hershberg, R., Eghtesady, P., Sydora, B., Brorson, K., Cheroutre, H., Modlin, R. and Kronenberg, M.: Expression of the thymus leukemia antigen in mouse intestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9727-9731 (1990).
13. Boyse, E. A.: The Biology of Tla. *Cell* **38**, 1-2 (1984).
14. Obata, Y., Taguchi, O., Matsudaira, Y., Hasegawa, H., Hamashima, N. and Takahashi, T.: Abnormal thymic development, impaired

- immune function and $\gamma\delta$ T cell lymphoma in a TL transgenic mouse strain. **J. Exp. Med.** **174**, 351-362 (1991).
15. Imani, F. and Soloski, M. J.: Heat shock proteins can regulate expression of the Tla region encoded class Ib molecule Qa-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**, 10475-10479 (1991).
16. Teitell, M., Mescher, M. F., Olson, C. A., Littman, D. R. and Kronenberg, M.: The thymus leukemia antigen binds human and mouse CD8. **J. Exp. Med.** **174**, 1131-1138 (1991).
17. Sanders, S. K., Giblin, P. A. and Kavathas, P.: Cell-cell adhesion mediated by CD8 and human histocompatibility leukocyte antigen G, a nonclassical major histocompatibility complex class I molecule on cytotrophoblast. **J. Exp. Med.** **174**, 737-740 (1991).
18. Yung Yu, C. and Milstein, C.: A physical map linking the five CD1 human thymocyte differentiation antigen genes. **EMBO J.** **8**, 3727-3732 (1989).
19. Blumberg, R. S., Terhorst, C., Bleicher, P., McDermott, F. V., Allan, C. H., Landau, S. B., Trier, J. S. and Balk, S. P.: Expression of a nonpolymorphic MHC class II-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. **J. Immunol.** **147**, 2518-2524 (1991).
20. Bilsland, C. A. G. and Milstein, C.: The identification of the β -2microglobulin binding antigen encoded by the human CD1D gene. **Eur. J. Immunol.** **21**, 71-78 (1991).
21. Balk, S. P., Bleicher, P. A. and Terhorst, C.: Isolation and expression of cDNA encoding the murine homologues of CD1. **J. Immunol.** **146**, 768-774 (1991).
22. Bleicher, P. A., Balk, S. P., Hagen, S. J., Blumberg, R. S., Flotte, T. J. and Terhorst, C.: Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. **Science** **250**, 679-682 (1990).
-
- 別刷請求先：
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学第1病理学教室 高山 晋一